



Exploration du milieu vivant par microseconde nucléaire

P. Moretto

► To cite this version:

P. Moretto. Exploration du milieu vivant par microseconde nucléaire. École thématique. Ecole Joliot Curie "Noyau, champ et cortège", Maubuisson, (France), du 13-18 septembre 1999 : 18ème session, 1999. cel-00654187

HAL Id: cel-00654187

<https://cel.hal.science/cel-00654187>

Submitted on 21 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Exploration du milieu vivant par microsonde nucléaire

Ph. Moretto

*Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan,
BP 120, Le Haut Vigneau, 33175 Gradignan cedex*

RESUME

La microsonde nucléaire est un instrument de microanalyse chimique élémentaire bien adapté à la mesure d'éléments trace dans les milieux vivants. Elle tire parti des différents produits de réaction émis au cours de l'interaction de particules chargées avec la matière dans le domaine du MeV. La fluorescence X induite (PIXE), la rétrodiffusion Rutherford (RBS), l'analyse par réactions nucléaires et la microscopie ionique en transmission (STIM) sont des techniques d'analyse et d'imagerie qui peuvent être mises en œuvre simultanément à l'aide de ce microfaisceau. Les analyses peuvent être réalisées avec une sensibilité de l'ordre de la partie par million, la résolution spatiale du micromètre et en mode multi-élémentaire. La combinaison des techniques de cartographie chimiques et de microscopie ionique permet d'obtenir tout une gamme d'informations sur la cible en cours d'analyse.

ABSTRACT

The nuclear microprobe is an instrument of element microanalysis, with imaging capabilities, particularly suitable for the measurement of trace elements in biological tissues. It makes use of the numerous types of emitted radiation resulting from the interaction of MeV charged particles with matter. Particle Induced X-ray Emission, Rutherford Backscattering Spectrometry, Nuclear Reaction Analysis and Scanning Transmission Ion Microscopy are analysis or imaging techniques which can be simultaneously carried out using a particle microbeam. The analysis may be routinely achieved at the part per million level of sensitivity, the micron spatial resolution and in multi-elemental mode. In addition, the combination of elemental mapping with high resolution STIM imaging allows the technique to provide a wealth of useful information on the sample under investigation.

I. INTRODUCTION

L'idée d'utiliser des particules chargées comme projectile pour la mise en œuvre des techniques de fluorescence X date de 1970 (Johansson *et al.*, 1970). Johansson utilise un faisceau intense de protons de quelques MeV, délivré par un accélérateur électrostatique, associé à un détecteur X de type Si(Li), ce qui permet alors d'obtenir une méthode d'analyse multi-élémentaire très sensible : la technique PIXE (Particle Induced X-ray Emission). Cette sensibilité est due essentiellement à l'intensité des faisceaux de particules disponibles, à leur pouvoir ionisant et surtout à l'excellent rapport signal/bruit de fond, bien meilleur que celui obtenu avec des tubes à rayons X ou des faisceaux d'électrons.

II. LA MICROSONDE NUCLEAIRE

Depuis ces premiers travaux, le principal développement fut l'avènement des microfaisceaux de particules. En effet, depuis une quinzaine d'années, se sont développées les techniques de focalisation des faisceaux d'ions de quelques MeV. Elles permettent de réduire la taille des faisceaux jusqu'à des dimensions microscopiques. Il est alors possible, en balayant l'échantillon, d'obtenir une analyse point par point et donc une cartographie chimique élémentaire.

Les accélérateurs de particules utilisés sont généralement de type électrostatique (Typiquement Van de Graaff de 2 à 4 MV). Ils délivrent des faisceaux continus intenses de protons ou particules alpha avec une très bonne stabilité en énergie ($\frac{\Delta E}{E} \leq 10^{-3}$). Les optiques de focalisation n'étant pas parfaitement achromatiques, cette stabilité est absolument nécessaire pour l'obtention de ces microfaisceaux. L'optique focalisante est généralement constituée par des lentilles quadrupolaires magnétiques associées sous forme de doublet, triplet ou quadruplet. Elles permettent d'obtenir dans le plan de l'échantillon (plan focal image de l'optique) un faisceau dont le diamètre est inférieur à un micromètre.

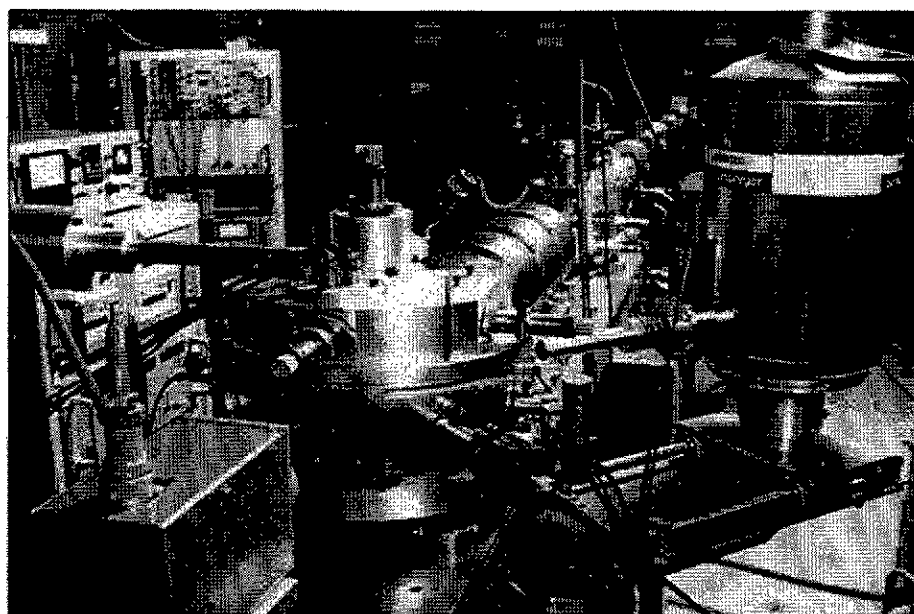


Fig. 1 : La ligne micro-faisceau du CENBG. La chambre d'analyse est au premier plan ; au second plan on distingue les quatre lentilles de focalisation.

Ces microsondes permettent non seulement de mettre en œuvre les techniques de fluorescence mais également des techniques plus spécifiquement "nucléaires": analyse par réactions nucléaires, retrodiffusion Rutherford (Rutherford Backscattering Spectrometry) ou encore microscopie ionique en transmission (Scanning Transmission Ion Microscopy). Ces techniques sont complémentaires. On peut ainsi accéder aux éléments très légers ($Z \leq 10$) par réaction nucléaire en complément de l'analyse PIXE, cette dernière ne permettant pas de doser ces éléments. Par ailleurs, une information isotopique est disponible (information

sur A) contrairement à la fluorescence qui donne une information chimique (détection en Z). On peut également mettre en œuvre simultanément PIXE et RBS. En effet, la technique de diffusion Rutherford autorise le dosage des principaux constituants de toute matière organique (C^{12} , N^{14} , O^{16}), ce qui permet de déterminer la masse de l'échantillon irradié et donc d'exprimer les résultats quantitatifs en termes de concentration.

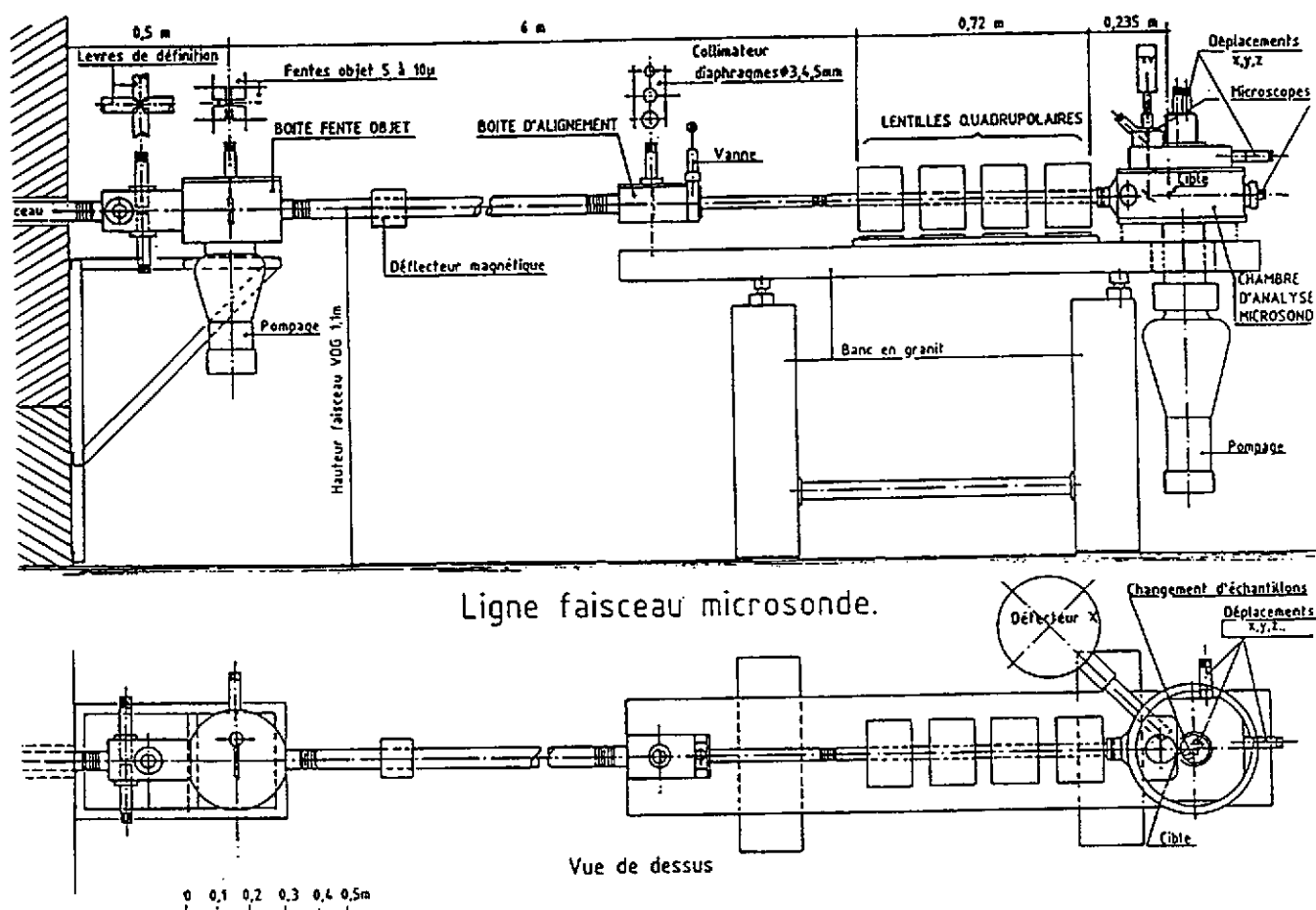


Fig. 2 : La ligne micro-faisceau du CENBG : vues de profil et de dessus.

Intérêt de la fluorescence X induite

Grâce à l'utilisation de détecteur X en dispersion d'énergie de type semi-conducteur Si(Li), la nature multi-élémentaire de la technique permet de cartographier plus d'une dizaine d'éléments au cours de la même analyse avec des dimensions de balayage variant de 20 μm à 2 mm et une résolution spatiale optimale de l'ordre du micromètre.

Au delà de ces spécificités liées à la mise en œuvre sur microsonde nucléaire, on peut rappeler les avantages plus particulièrement associés à la technique PIXE :

- une très bonne sensibilité, en analyse de routine, sur la majeure partie du tableau périodique ($Z > 10$), avec une limite relative inférieure de détection de l'ordre du 10^{-6} g/g et une limite absolue en

microfaisceau de 10^{-16} g. Cette limite peut être optimisée sur une zone particulière du tableau périodique en choisissant l'énergie des particules incidentes et le type de raies X détectées (raie K ou L). Dans ces conditions, cette valeur ne varie pas plus d'un ordre de grandeur (entre 10^{-5} et 10^{-6} g/g) sur le domaine $10 < Z < 92$.

- l'analyse PIXE est extrêmement sure. L'identification des raies X est non ambiguë et les interférences spectrales généralement limitées. Les codes actuels de déconvolution des spectres de fluorescence X permettent de résoudre la plupart des situations en cible mince et obtenir des résultats quantitatifs absolus sans faire appel à des échantillons standards. Les rendements d'émission X sont, en effet, bien connus ainsi que la réponse des détecteurs à semi-conducteur. Ces codes permettent également de travailler en cible épaisse, situation où interviennent des effets de matrice sous forme de ralentissement des projectiles et d'atténuation du rayonnement X émis. Ces phénomènes peuvent être modélisés de manière assez simple et l'analyse en cible épaisse est de plus en plus utilisée dans des cas où aucune alternative n'est possible.

- le peu d'influence de la matrice sur l'analyse PIXE peut cependant être interprété comme une limitation. En effet, aucun renseignement sur l'environnement chimique de l'élément détecté n'est accessible ; pas plus que d'information isotopique. Il faut également noter que les échantillons doivent être placés sous vide pour l'irradiation, ce qui pour des tissus vivants hydratés, nécessite l'emploi de techniques de préparation sophistiquées, la plus sûre étant la cryofixation/lyophilisation. Enfin, la principale limitation de cette technique est due aux dommages occasionnés par le dépôt d'énergie dans l'échantillon de particules de plusieurs MeV. Ce problème est particulièrement aiguë en microfaisceau où le volume d'interaction ne dépasse pas quelques μm^3 .

Domaines d'application

L'analyse PIXE est particulièrement bien adaptée au dosage d'éléments lourds dans des matrices légères. Elle excelle donc dans l'analyse de tissus vivants où la matrice organique n'émet qu'un rayonnement X de très basse énergie. Elle permet le dosage des métaux traces essentiels (Mn, Fe, Cu, Zn ...) et des minéraux (Na, Mg, P, S, K, Ca...), des éléments endogènes impliqués dans le métabolisme de tout être vivant. Elle autorise également le dosage des métaux lourds et des toxiques, que ce soit dans le cadre d'études environnementales (pollution par Cd, Hg, Pb...) ou d'études de toxicologie/pharmacologie. Mise en oeuvre à l'aide d'une microsonde nucléaire, l'analyse de coupes de tissus, non incluses dans des résines est possible soit à l'échelle du tissu, soit à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Quelques applications biomédicales des microsondes nucléaires sont présentées à la fin de ce cours. Pour une revue plus détaillée, le lecteur pourra se référer à (Moretto et Llabador, 1997).

III. LES BASES DE LA FLUORESCENCE X INDUITE PAR PARTICULE CHARGÉE

Les techniques de fluorescence X sont basées sur l'excitation du cortège électronique par ionisation des couches atomiques profondes (K ou L) ; la désexcitation produisant ensuite l'émission d'un rayonnement X caractéristique. Rappelons ici quelques notions de base qui permettront au lecteur d'aborder cette technique de manière pratique et surtout d'en comprendre les spécificités. Pour de plus amples détails, on pourra se référer à (Mitchell et Barfoot, 1981), (Cohen et Clayton, 1989) et (Johansson et Johansson, 1976).

On peut schématiser l'émission de fluorescence X comme un processus en deux étapes; l'ionisation puis l'émission X proprement dite. A de rares exceptions près¹, l'atome ionisé n'a pas le "souvenir" de la manière dont il a été amené dans cet état que ce soit au cours de l'interaction avec un proton, un électron ou encore un photon X. Nous rappellerons donc brièvement dans un premier temps les principes de l'émission X de façon totalement indépendante du phénomène ionisateur.

L'émission de fluorescence X

Le réarrangement du cortège électronique résultant de la création d'une lacune dans une couche interne (K ou L) peut s'accompagner de l'émission de raies X. Lorsque la lacune est comblée par un électron provenant d'une couche plus externe, la transition libère une énergie correspondant à la différence des énergies de liaison sur les couches électroniques impliquées.

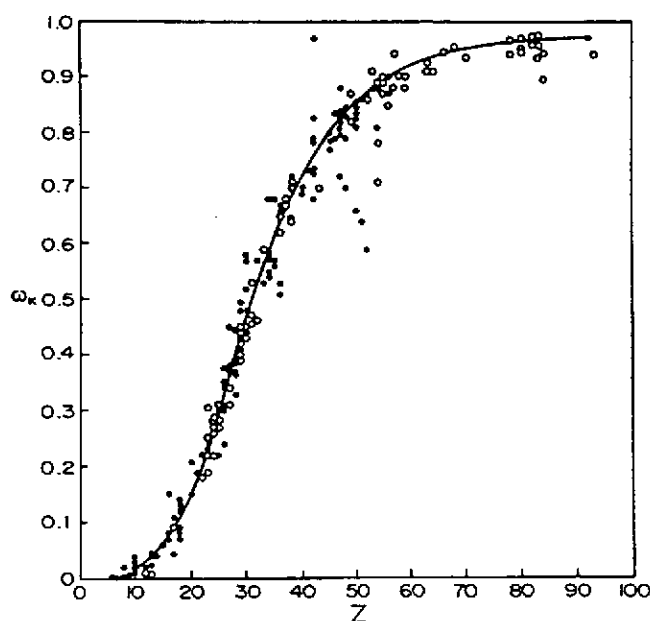


Fig.3: Rendement de fluorescence expérimental ω_K en fonction du numéro atomique, d'après (Bambynek et al., 1972)

Cette énergie peut alors soit être dissipée directement par émission X (émission radiative), soit être transférée à un électron périphérique, qui est éjecté. On parle alors d'émission Auger, un processus non-radiatif qui entre en compétition avec l'émission X. La contribution relative des deux phénomènes est généralement caractérisée, pour un élément et une couche donnée, par le rendement de fluorescence ω . Ce paramètre représente la

¹ lorsque l'ionisation provient d'une collision avec un ion lourd, les cortèges électroniques des deux partenaires peuvent se recouvrir pendant un temps suffisamment long pour qu'il y ait formation d'orbitales quasi-moléculaires. Dans ce cas, la nature du projectile influe donc sur les caractéristiques des transitions électroniques ultérieures.

probabilité pour qu'une lacune créée sur cette couche donne lieu à l'émission d'un photon X. A titre d'exemple, l'évolution de ω_K , rendement pour la couche K, en fonction du numéro atomique Z est décrite sur la Fig. 3. Il apparaît nettement que l'émission Auger est prépondérante pour les faibles numéros atomiques.

Seules certaines transitions électromagnétiques, de type dipolaire électrique, sont autorisées par les règles de sélection:

$$\Delta n \geq 1, \quad \Delta l = \pm 1 \quad \text{et} \quad \Delta j = \pm 1 \text{ ou } 0$$

où n , l et j représentent respectivement le nombre quantique principal et les nombres quantiques associés aux moments angulaires orbital et total.

Il en résulte que les seules raies X qui puissent être émises à la suite d'une ionisation de la couche K proviennent des transitions L_2 -K et L_3 -K (d'après la nomenclature de Siegbahn, raies $K\alpha_1$ et $K\alpha_2$) ou encore des transitions M-K et N-K (raies $K\beta_1$, $K\beta_2$ et $K\beta_3$).

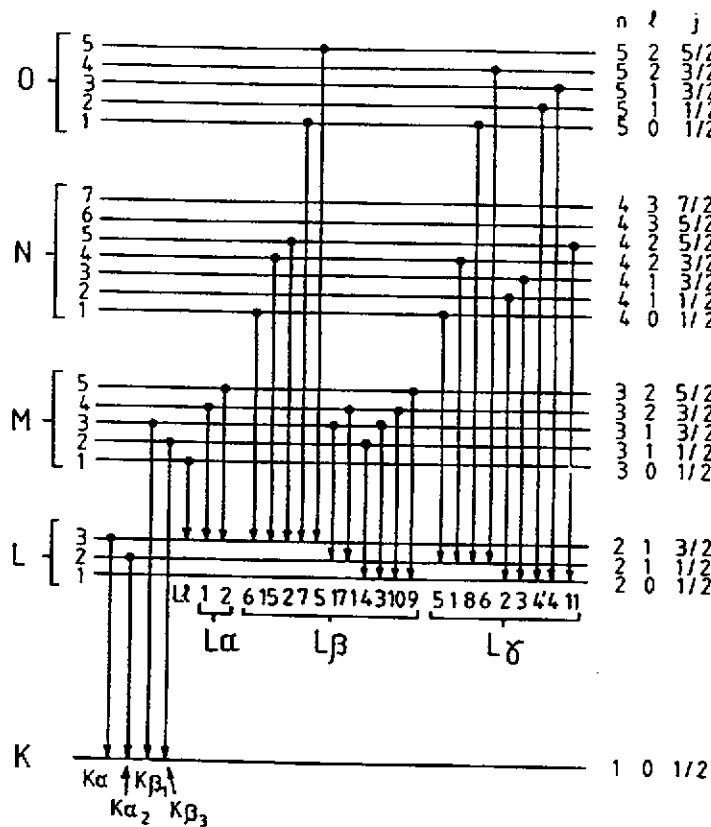


Fig. 4 : Les principales transitions radiatives permises (Séries K et L) dans la notation conventionnelle (Siegbahn) à gauche et dans la notation spectroscopique à droite (Cohen et Clayton, 1989)

Bien que les probabilités relatives d'émission varient en fonction du numéro atomique, l'émission du groupe $K\beta$ est généralement moins probable que celle du groupe $K\alpha$. Les différences d'énergie entre les raies $K\alpha_1$, $K\alpha_2$, puis $K\beta_1$, $K\beta_2$ et $K\beta_3$, sont inférieures à la résolution des détecteurs Si(Li), et ce jusqu'au numéro

atomique $Z = 35$. Ces raies K sont donc au moins partiellement convoluées et apparaissent sur les spectres sous la forme d'un doublet $K\alpha/K\beta$ très caractéristique.

Lorsque la lacune initiale est créée dans une des sous-couches L, des transitions non radiatives, dites de Koster-Krönig, peuvent avoir lieu entre les niveaux d'une même couche. Ces transitions, plus rapides que les transitions inter-couches, provoquent alors une redistribution des lacunes entre les trois sous-couches L_1 , L_2 et L_3 avant la transition finale.

La situation est donc beaucoup plus complexe que pour la couche K et on doit définir un rendement de fluorescence ω_{Li} ($i = 1,2,3$) pour chaque sous-couche. C'est en général ω_{L3} qui est le plus élevé, les lacunes ayant tendance à se localiser sur L_3 après la série des transitions Koster-Krönig. Ces rendements sont beaucoup plus faibles que pour la couche K. Les transitions radiatives permises sont illustrées sur la Fig. 4, et les énergies des principales raies X sont portées sur la Fig. 5 en fonction du numéro atomique Z de l'atome émetteur. Les intensités relatives entre ces différentes raies sont bien connues tout au moins pour les transitions K. Pour les raies L, les valeurs dépendent de la sous-couche impliquée dans la transition. Or les sections efficaces d'ionisations sont différentes pour chacune des sous-couches L_i et varient en fonction du projectile. Il est donc difficile de donner des valeurs générales pour ces raies L. Pour une étude détaillée, se reporter à (Salem *et al.*, 1974).

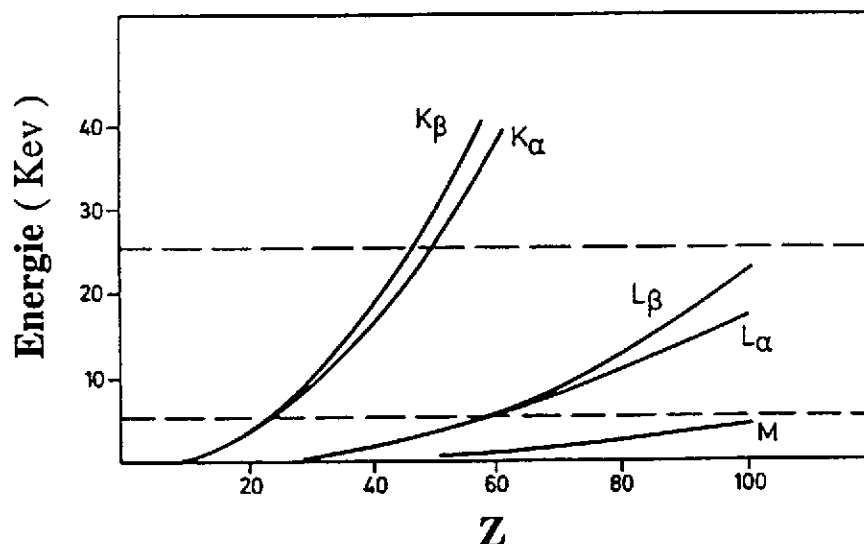


Fig. 5 : Énergies caractéristiques des raies K, L et M en fonction du numéro atomique Z (d'après Mitchell et Barfoot, 1981)

L'ionisation par particules chargées

Des particules chargées (proton, alpha) peuvent être utilisées comme projectiles. Les modèles théoriques permettant de rendre compte de l'ionisation des couches atomiques profondes sont basés sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et une particule chargée incidente dans une gamme d'énergie où les partenaires de la collision peuvent être considérés comme des particules de charge ponctuelle. Ces approches théoriques se limitent généralement aux protons et particules alpha dans la gamme d'énergie 1-5 MeV. Parmi

les modèles les plus couramment employés, on peut citer l'approximation de Born en ondes planes (Plane Wave Born Approximation) (Merzbacher et Lewis, 1958), l'approximation semi-classique (Semi-classical Approximation, SCA) (Hansteen et Mosebeke, 1973), ou encore l'approximation du choc binaire (Binary Encounter Approximation, BEA) (Garcia, 1970).

La probabilité d'ionisation d'une couche atomique est décrite par la section efficace d'ionisation σ_i . Les valeurs prédites par les différents modèles théoriques sont en général en bon accord ($\pm 30\%$) avec les données expérimentales, ce qui semble satisfaisant si l'on note que les variations en fonction du numéro atomique Z de l'atome ionisé peuvent atteindre 3 à 4 ordres de grandeurs. Elles rendent compte en particulier:

- de la décroissance rapide de σ_i en fonction du numéro atomique de l'atome cible, pour une énergie d'incidence E fixée
- de la variation de σ_i en fonction de l'énergie E d'incidence pour un atome cible donné. σ_i croît en fonction de E et atteint une valeur maximale lorsque la vitesse de l'ion incident est comparable à celle de l'électron sur sa couche
- de la dépendance de σ_i en $\left(\frac{E}{4}\right)^4$ en fonction de l'énergie par nucléon du projectile E/A . Ceci explique notamment l'utilisation préférable de particules légères (protons) si l'on veut optimiser σ_i .

L'incertitude sur la valeur absolue de ces sections efficaces est cependant encore trop grande pour qu'elles puissent être employées dans le calcul de résultats quantitatifs lors de la mise en œuvre d'une technique d'analyse. Dès 1976, Johansson développe une formule semi-empirique, à partir du modèle de Garcia dans le cadre de la théorie BEA. Ce modèle prédit l'existence d'une fonction universelle, valable pour tous les éléments et pour des protons dans une gamme d'énergie autour de quelques MeV. Celle-ci permet d'exprimer le produit $\sigma_i U_j^2$ (σ_i est la section efficace d'ionisation, U_j est l'énergie de liaison sur la couche j , avec $j = K$

ou L) en fonction de $\frac{E}{\lambda U_j}$ (E est l'énergie d'incidence et λ le rapport des masses proton sur électron) :

$$\text{Ln}(\sigma_i U_j^2) = \sum_{n=1}^5 b_n x^n \quad \text{avec} \quad x = \text{Ln}\left(\frac{10^{-3} E}{\lambda U_j}\right)$$

Si on exprime E et U_j en eV et si on prend 10^{-14} cm^2 comme unité de section efficace, on peut porter les valeurs expérimentales de $\sigma_i U_j^2$ pour les couches K et L, sur le graphe suivant :

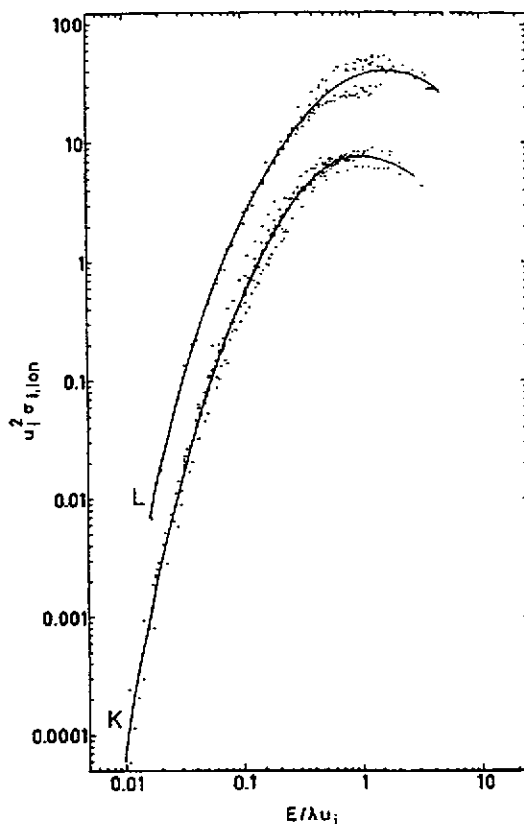


Fig. 6 : Tracés des valeurs expérimentales (points noirs) utilisées pour le calcul de la fonction semi-empirique. Les courbes en trait plein représentent le polynôme d'ordre 5 ajusté sur ces valeurs.

Par ailleurs, une nouvelle approche développée sur la base des travaux de Merzbacher et Lewis, la théorie "ECPSSR", prend en compte les différentes corrections illustrées dans cette abréviation : (Energy loss, Coulomb field, Perturbation of the atomic Stationary States, Relativistic effects). Ce modèle développé par Brandt et Lapicki (1981) est ensuite utilisé par Cohen et Harrigan (1985)

pour calculer et publier une table des sections efficaces d'ionisation en protons et particule alpha qui est aujourd'hui couramment employée. Enfin Johansson et Campbell (1988) vérifient les valeurs prédites par la théorie ECPSSR grâce à la formule semi-empirique de Johansson. Ces valeurs font actuellement référence dans le domaine. Elles sont utilisées en particulier par GUPIX, un programme de traitement des données pour l'analyse PIXE, développé par Campbell et largement utilisé aujourd'hui (Maxwell et Campbell, 1989).

A partir des paramètres précédemment décrits, on peut définir la section efficace de production d'une raie X de la manière suivante : $\sigma_p = \sigma_i \omega b$ où ω est le rendement de fluorescence de la couche impliquée et b l'intensité relative d'émission de la raie considérée. Grime et Watt (1984) ont tracé ces sections efficaces pour des protons, à partir des valeurs de Johansson pour l'émission des raies $K\alpha$ et des raies L (cumulées) en fonction de l'énergie d'incidence et pour différents éléments émetteurs (Fig. 7). Ces sections efficaces peuvent dépasser la centaine de barns pour l'émission de raies $K\alpha$ par des éléments entre Al et Br. Il en est de même pour les raies L par des éléments entre Br et U. Il est nettement visible que l'on peut optimiser ces sections efficaces sur les éléments les plus lourds en augmentant l'énergie d'incidence.

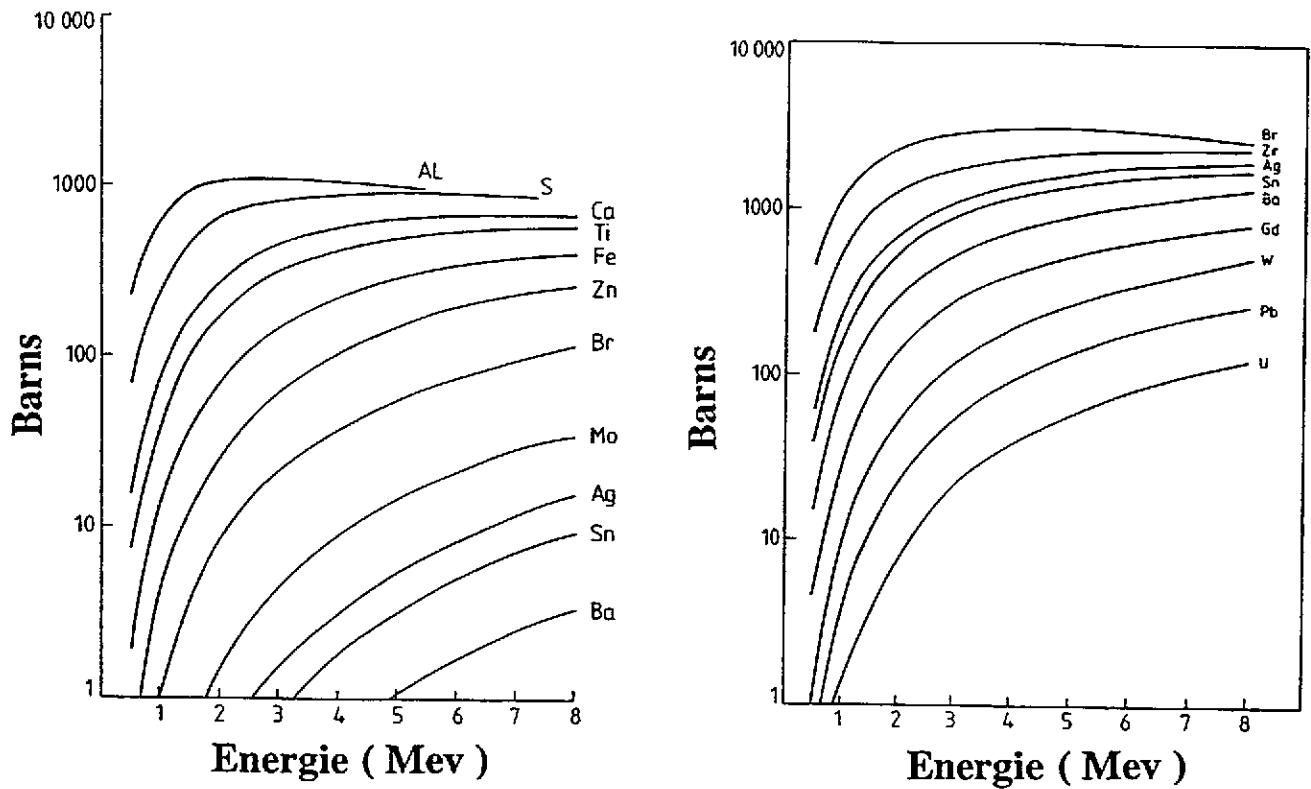


Fig. 6 : Sections efficaces de production des raies X de type $K\alpha$ (à gauche) et L cumulée (à droite) en fonction de l'énergie des protons incidents et pour quelques éléments caractéristiques.

Si l'on porte la limite relative de détection de la technique, exprimée en g/g, en fonction de l'énergie d'incidence des protons et du numéro atomique de l'atome émetteur (Fig. 7), on observe deux zones où la sensibilité est optimale. La première se situe pour $20 \leq Z \leq 30$ avec $1 \leq E_p \leq 3$ MeV (détection de raie K); la seconde pour $70 \leq Z \leq 90$ et $2 \leq E_p \leq 5$ MeV (détection de raie L). On peut enfin noter que quasiment tout le tableau périodique est couvert avec une limite relative de détection inférieure à $4 \cdot 10^{-6}$ g/g.

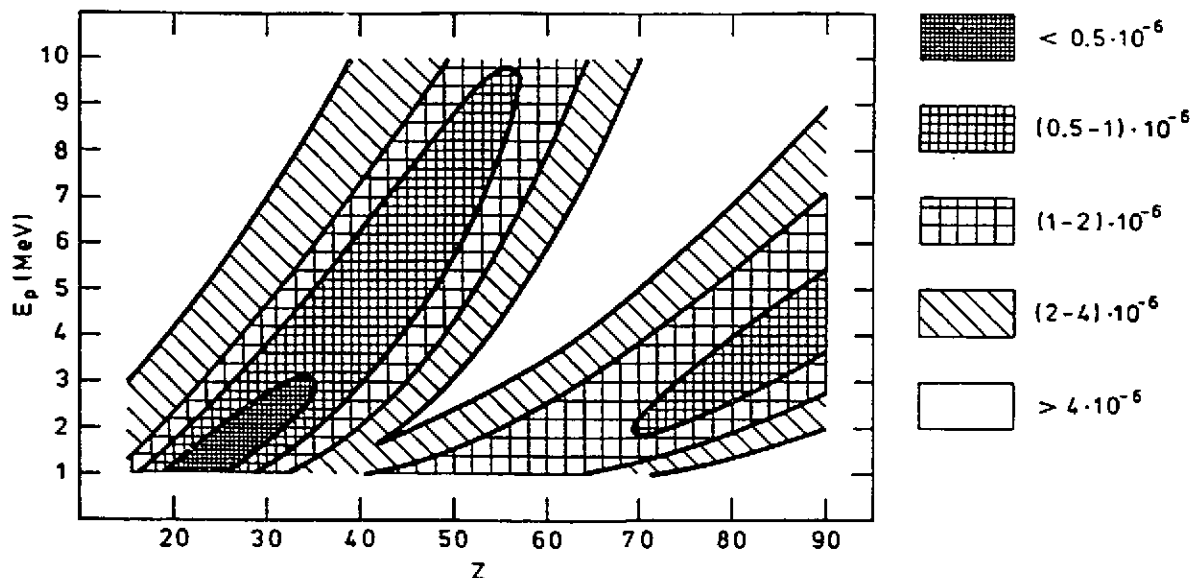


Fig. 7 : Concentration minimale détectable en cible mince, et pour une matrice de carbone, en fonction de l'énergie des protons et du numéro atomique de l'élément recherché (Johansson et Johansson, 1976)

Bruit de fond

La sensibilité de la technique PIXE peut être limitée par un bruit de fond continu apparaissant sur les spectres X. Il provient essentiellement des trois composantes suivantes:

- Le rayonnement de freinage (Bremsstrahlung) des électrons secondaires éjectés de la cible pendant l'irradiation. Ce rayonnement électromagnétique apparaît à chaque fois qu'une particule subit une accélération. Cette composante du bruit de fond est limitée à la partie basse énergie du spectre. La limite supérieure en énergie, E_{\max} , correspond à l'énergie maximale qu'un proton incident peut transmettre à un électron libre au cours d'une collision : $E_{\max} = 4 \frac{m_e}{M} E$
(où M est la masse du proton, E son énergie d'incidence et m_e la masse de l'électron).
- Le rayonnement de freinage des particules incidentes qui prédomine à haute énergie sur le spectre. La section efficace de ce phénomène:

$$\frac{d\sigma}{dE_x} = C \frac{AZ^2 Z_1^2}{EE_x} \left(\frac{Z}{A} - \frac{Z_1}{A_1} \right)$$

où :

E_x est l'énergie du rayonnement X émis

Z, A, E sont la charge, la masse et l'énergie de la particule incidente

Z_1, A_1 sont la charge et la masse de l'atome cible

On peut donc remarquer qu'elle est inversement proportionnelle à l'énergie E d'incidence. D'autre part la contribution de ce bremsstrahlung s'annule lorsque projectile et cible ont le même rapport Z/A . Pour la plupart des cibles, en particulier pour les matrices organiques, ce rapport est voisin de 1/2. Par conséquent, ce bruit de fond disparaît pour des alpha ou des ions lourds ; ce qui n'est pas le cas pour des protons.

- La diffusion Compton du rayonnement gamma émis éventuellement par la cible. Cette émission gamma est essentiellement due au phénomène d'excitation coulombienne des noyaux. Elle n'intervient de manière significative que si l'énergie d'incidence est supérieure à la barrière coulombienne du noyau cible. Pour des protons en dessous de 3 MeV, ce phénomène n'apparaît que rarement.

IV. LA MICROSCOPIE IONIQUE PAR TRANSMISSION

Analyse bi-dimensionnelle

La technique de microscopie ionique en transmission (STIM-Scanning Transmission Ion Microscopy) est basée sur un principe simple : l'échantillon à analyser est balayé par le micro-faisceau ; l'énergie résiduelle des ions transmis est mesurée grâce à un détecteur de particules (en général un détecteur à semi-conducteurs) placé à 0°. L'analyse est réalisée point par point, de manière à obtenir une cartographie bi-dimensionnelle de l'énergie transmise.

Dans cette gamme d'énergie, le ralentissement des ions est essentiellement de nature électronique et dépend, pour un matériau de composition donnée, de l'épaisseur de la cible traversée ou, plus exactement, de sa masse surfacique (en g/cm²). Ainsi, l'image obtenue par microscopie STIM constitue une cartographie point par point de la masse surfacique de l'échantillon. Expérimentalement, l'épaisseur de la cible analysée est limitée par le parcours des ions dans le matériau, à savoir quelques centaines de microns dans un échantillon biologique déshydraté, pour des protons de quelques MeV.

Une telle géométrie de détection impose des courants sur cible très faibles, ne dépassant pas quelques milliers d'ions par seconde (< 1 femtoampère). Néanmoins, quelques minutes suffisent en général pour obtenir une statistique correcte, compte tenu de l'efficacité de collection des ions (~100 %). L'utilisation de courants aussi faibles confère à la technique STIM deux avantages intéressants :

- le faisceau étant fortement collimaté et finement focalisé, la résolution spatiale obtenue est inférieure au micromètre.
- la dose reçue par l'échantillon étant très faible, l'analyse STIM ne provoque pratiquement aucun dommage sur la cible.

Calcul de densité

Dans la plupart des applications, la microscopie STIM est utilisée de façon qualitative, pour l'imagerie 2D de petits échantillons. Le paramètre de contraste de l'image est alors directement lié à la perte d'énergie des ions transmis. Cependant, une cartographie quantitative de l'épaisseur de l'échantillon peut également être obtenue. Le principe est de convertir le ralentissement des ions en une épaisseur traversée, par l'intermédiaire du pouvoir d'arrêt du matériau :

$$(\rho x) = \int_{E_0}^{E_0 - \Delta E} \left[\frac{dE}{d(\rho x)} \right]^{-1} dE \quad (1)$$

Dans cette expression, $\left[\frac{dE}{d(\rho x)} \right]$ désigne le pouvoir d'arrêt (en $\text{keV} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$), ρ la masse volumique du matériau, et (ρx) l'épaisseur traversée (en g/cm^2). Les limites d'intégration E_0 et $E_0 - \Delta E$ sont respectivement l'énergie incidente et transmise de l'ion (en keV).

Des tables de pouvoirs d'arrêt (Janni, 1982 ; Andersen et Ziegler, 1977) existent pour la plupart des éléments et pour certains composés usuels. Pour des composés (ou des mélanges), ces pouvoirs d'arrêt peuvent être calculés à partir de la règle d'additivité de Bragg:

$$\left[\frac{dE}{d(\rho x)} \right]_{\text{matériau}} = \sum_{\text{éléments } i} f_i \left[\frac{dE}{d(\rho x)} \right]_{\text{élément } i}$$

où f_i désigne la fraction massique de l'élément i dans le matériau. Lorsque la composition du matériau est connue, une simple intégration en énergie du pouvoir d'arrêt permet donc d'obtenir la masse surfacique de l'échantillon.

Intérêt

La microscopie STIM est particulièrement employée en complément de la technique PIXE. En effet, cette technique ne permet pas toujours d'identifier les différentes structures apparaissant sur les cartographies chimiques élémentaires 2D. Ceci peut être fait en réalisant une image STIM avant l'analyse PIXE. Cette méthode est d'autant plus utile que, très souvent, les échantillons analysés sont opaques au microscope optique. En STIM la seule préparation nécessaire est une simple cryofixation / lyophilisation afin de permettre l'analyse sous vide, ce qui préserve la structure de l'échantillon ainsi que les distributions élémentaires.

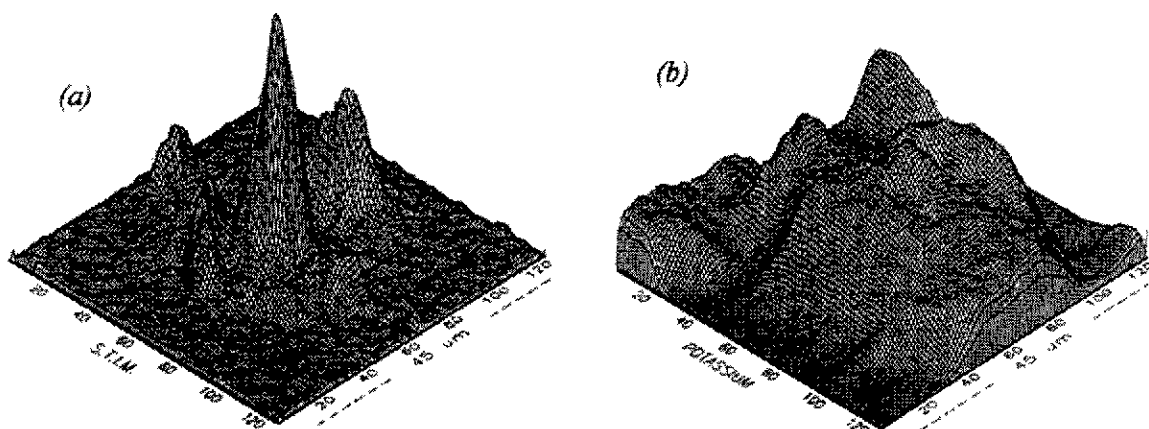


Fig.8 : Etude en microscopie STIM (a) et PIXE (b) d'une cellule cancéreuse mononucléée (lignée IGROV1). L'analyse a été réalisée à l'aide d'un faisceau de protons 2,5 MeV ; dimensions du balayage $45 \times 45 \mu\text{m}^2$. Un noyau au contour bien caractérisé et un nucléole central sont visibles. Les variations en densité sont représentées sur un axe vertical. Comparée à l'image PIXE du potassium (b) l'image STIM apporte une information de structure et facilite l'interprétation des distributions élémentaires observées.

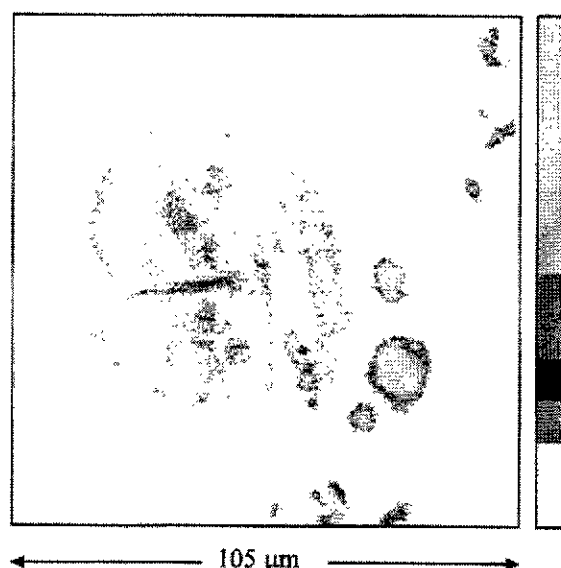


Fig. 9 : Image STIM d'une cellule cancéreuse ovarienne polynucléée (lignée IGROV1), réalisée avec la microsonde nucléaire du CENBG, à l'aide d'un faisceau de protons de 2,5 MeV. Les zones de forte densité ont été sélectionnées, correspondant aux événements de basse énergie du spectre. Cette image met en évidence trois lobes nucléaires au contour bien caractérisé ainsi que des nucléoles à l'intérieur.

Analyse tri-dimensionnelle par tomographie

Une évolution de cette technique fonctionne maintenant sur la ligne microfaisceau du CENBG (Michelet et Moretto, 1999). L'originalité de la méthode, basée sur le principe de tomographie, réside dans sa capacité à produire des cartes tridimensionnelles en densité. L'objet, fixé sur la pointe d'un capillaire, est analysé projection par projection (une centaine sur 180°) par un faisceau de protons. La reconstruction numérique de la matrice densité est ensuite obtenue plan par plan à l'aide d'algorithmes analytiques dérivés de ceux employés sur les scanners médicaux à rayon X. Cette technique (Tomographie STIM) permet de résoudre des objets de taille inférieure à $200\ \mu\text{m}$ et ce, avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre.

Reconstruction d'un plan de coupe

Le principe de tomographie consiste à reconstruire un plan de coupe à partir de l'analyse de projections sous différents angles. Le spécimen est fixé sur un axe de rotation perpendiculaire au faisceau (Fig. 10). Pour chaque plan de coupe, le processus de projection se décompose en deux étapes :

- i) une translation du faisceau le long de l'axe u , le spécimen étant balayé point par point sur toute sa largeur ;
- ii) une rotation de l'objet, avec un pas angulaire de l'ordre de 1 degré.

Ces deux étapes sont répétées jusqu'à avoir visualisé l'échantillon sur un intervalle angulaire d'au moins 180 degrés.

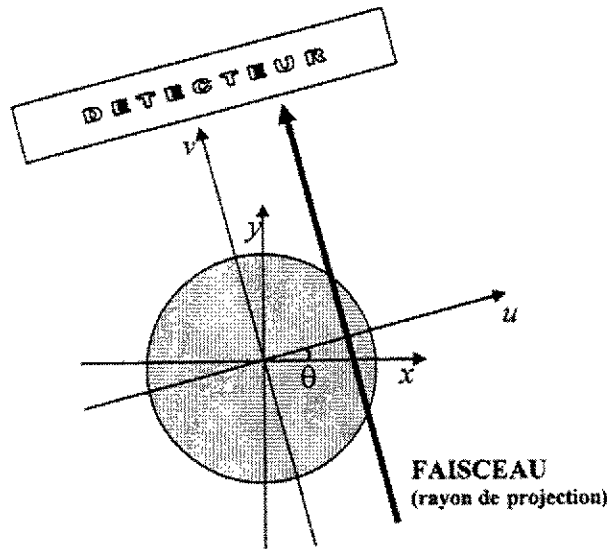


Fig. 12 : Le problème de reconstruction en géométrie parallèle. Le disque grisé matérialise le plan de coupe visualisé par tomographie. L'échantillon est balayé point par point sur toute sa largeur : la direction de projection est représentée par l'axe v .

On désignera par $f(x, y)$ la grandeur physique locale recherchée (masse volumique locale). Le but est de reconstruire f dans le plan de coupe analysé, à partir des valeurs projetées $p(u, \theta)$ définies par :

$$p(u, \theta) = \int_{\text{rayon}} f(x, y) dv \quad \text{avec : } \begin{cases} x = u \cos \theta - v \sin \theta \\ y = u \sin \theta + v \cos \theta \end{cases} \quad (2)$$

Expérimentalement, cette intégrale traduit le fait qu'à chaque position (u, θ) du faisceau d'ions, la valeur mesurée $p(u, \theta)$ représente la somme cumulée des valeurs de $f(x, y)$ le long du rayon de projection. Dans le cas de la tomographie STIM, $p(u, \theta)$ désigne l'épaisseur de l'échantillon, i.e. l'intégrale de la densité $f(x, y)$ le long du trajet du faisceau.

La fonction p est appelée transformée de Radon de f . Le terme de « projection » désigne l'ensemble des valeurs de $p(u, \theta)$ mesurées à θ fixé.

Reconstruction analytique par rétroprojection

Historiquement, la solution mathématique complète du problème de reconstruction a été énoncée par Radon en 1917. Une description détaillée de la méthode dite « de rétroprojection » peut être trouvée dans (Brooks et Di Chiro, 1976) et (Peyrin et al., 1996).

La rétroprojection permet de déterminer très simplement une estimation $\hat{f}(x, y)$ de la grandeur physique locale $f(x, y)$ que l'on cherche à reconstruire, en superposant les données provenant de toutes les projections. Plus exactement, le processus de rétroprojection des valeurs mesurées $p(u, \theta)$ s'écrit :

$$\hat{f}(x, y) = \int_0^\pi p(u, \theta) d\theta \quad \text{avec : } u = x \cos \theta + y \sin \theta$$

Ceci revient à sommer les contributions de tous les rayons de projection passant par le point (x, y) considéré.

Un exemple simple de reconstruction par rétroprojection à partir de seulement deux angles de vue permettra de comprendre qualitativement le processus. On considère un spécimen fictif, représenté

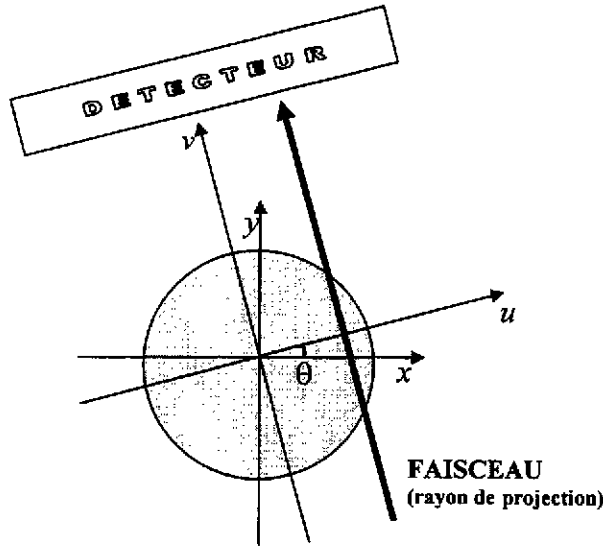


Fig. 12 : Le problème de reconstruction en géométrie parallèle. Le disque grisé matérialise le plan de coupe visualisé par tomographie. L'échantillon est balayé point par point sur toute sa largeur ; la direction de projection est représentée par l'axe v .

On désignera par $f(x,y)$ la grandeur physique locale recherchée (masse volumique locale). Le but est de reconstruire f dans le plan de coupe analysé, à partir des valeurs projetées $p(u, \theta)$ définies par :

$$p(u, \theta) = \int_{\text{rayon}} f(x, y) dv \quad \text{avec : } \begin{cases} x = u \cos \theta - v \sin \theta \\ y = u \sin \theta + v \cos \theta \end{cases} \quad (2)$$

Expérimentalement, cette intégrale traduit le fait qu'à chaque position (u, θ) du faisceau d'ions, la valeur mesurée $p(u, \theta)$ représente la somme cumulée des valeurs de $f(x,y)$ le long du rayon de projection. Dans le cas de la tomographie STIM, $p(u, \theta)$ désigne l'épaisseur de l'échantillon, i.e. l'intégrale de la densité $f(x,y)$ le long du trajet du faisceau.

La fonction p est appelée transformée de Radon de f . Le terme de « projection » désigne l'ensemble des valeurs de $p(u, \theta)$ mesurées à θ fixé.

Reconstruction analytique par rétroprojection

Historiquement, la solution mathématique complète du problème de reconstruction a été énoncée par Radon en 1917. Une description détaillée de la méthode dite « de rétroprojection » peut être trouvée dans (Brooks et Di Chiro, 1976) et (Peyrin et al., 1996).

La rétroprojection permet de déterminer très simplement une estimation $\hat{f}(x,y)$ de la grandeur physique locale $f(x,y)$ que l'on cherche à reconstruire, en superposant les données provenant de toutes les projections. Plus exactement, le processus de rétroprojection des valeurs mesurées $p(u, \theta)$ s'écrit :

$$\hat{f}(x, y) = \int_0^\pi p(u, \theta) d\theta \quad \text{avec : } u = x \cos \theta + y \sin \theta$$

Ceci revient à sommer les contributions de tous les rayons de projection passant par le point (x,y) considéré.

Un exemple simple de reconstruction par rétroprojection à partir de seulement deux angles de vue permettra de comprendre qualitativement le processus. On considère un spécimen fictif, représenté

par une matrice objet de 6×6 pixels, avec un seul pixel de densité f non nulle (Fig. 13). Lors du processus de projection, les densités sont sommées le long de chaque rayon de projection. Inversement, les 2×6 valeurs de $p(u, \theta)$ ainsi obtenues sont ensuite rétroprojetées afin de reconstruire une image tomographique \hat{f} de l'objet initial.

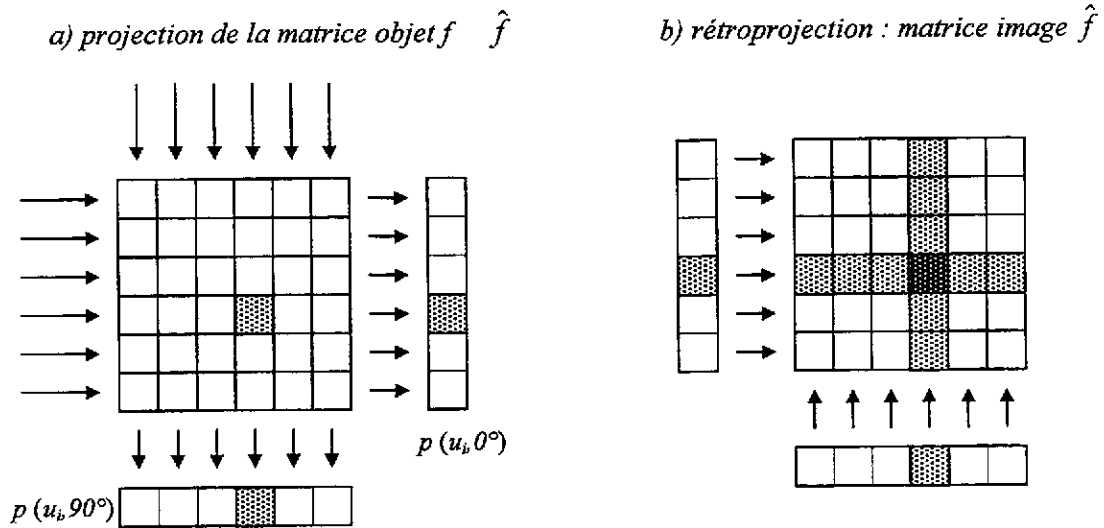


Fig. 13 : Projection et rétroprojection à partir de deux angles de vue (0° et 90°). La distribution en densité de la matrice objet réapparaît dans l'image reconstruite par contraste entre les différents pixels. Cependant, la reconstruction génère des pixels artefacts autour du pixel central.

Cet exemple simple met en évidence des pixels de densité non nulle artificiellement générés dans l'image reconstruite, formant un artefact « en étoile » autour du pixel central. La modélisation analytique du problème de reconstruction dans l'espace de Fourier permet de montrer que l'image \hat{f} obtenue par rétroprojection directe peut être en fait interprétée comme la convolution de l'image réelle f par une fonction en $1/r$, avec $r = \sqrt{x^2 + y^2}$. Compte tenu de ce résultat, il suffit donc de mettre en œuvre une méthode de déconvolution pour avoir accès à l'image réelle f . La plus utilisée est la méthode de rétroprojection filtrée, basée sur une formule d'inversion *exacte* obtenue à partir d'un raisonnement dans l'espace de Fourier.

Rétroprojection filtrée

La technique de rétroprojection filtrée permet de supprimer l'effet de convolution en $1/r$ de l'image reconstruite. Elle consiste à rétroprojeter des projections préalablement filtrées $p^*(u, \theta)$:

$$f(x, y) = \int_0^\pi p^*(u, \theta) d\theta \quad \text{avec: } u = x \cos \theta + y \sin \theta$$

Les projections filtrées $p^*(u, \theta)$ sont obtenues par un calcul dans l'espace de Fourier. On note $P(k, \theta)$ la transformée de Fourier à une dimension des projections $p(u, \theta)$:

$$P(k, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} p(u, \theta) e^{-i2\pi ku} du$$

La transformée de Fourier des projections est multipliée par une fonction de filtrage $G(k)$:

$$P^*(k, \theta) = P(k, \theta) \times G(k)$$

Le raisonnement mis en œuvre repose sur les relations directes existant entre les transformées de Fourier de f , de \hat{f} et de p . On obtient ainsi l'expression du filtre :

$$G(k) = |k|$$

Les projections filtrées $p^*(u, \theta)$ sont ensuite obtenues par transformée de Fourier inverse. Dans l'espace géométrique, l'effet du filtre consiste schématiquement à introduire une composante négative dans les projections $p^*(u, \theta)$. Au cours de la sommation angulaire, les contributions positives et négatives des différentes projections se compensent, de façon à supprimer le voilage en $1/r$ de l'image.

Sinogramme d'un plan de coupe

L'ensemble des données expérimentales obtenues dans l'analyse de chaque plan de coupe peut être représenté sur un même graphe, appelé sinogramme, dont un exemple est donné sur la Fig. 14. A chaque projection angulaire correspond une ligne horizontale du sinogramme, sur laquelle sont codées point par point les épaisseurs calculées pour chacun des 128 rayons de projection. En raison du mouvement de rotation de l'échantillon, la trajectoire de chaque point excentré par rapport à l'axe de rotation apparaît alors sous la forme d'une trajectoire sinusoïdale.

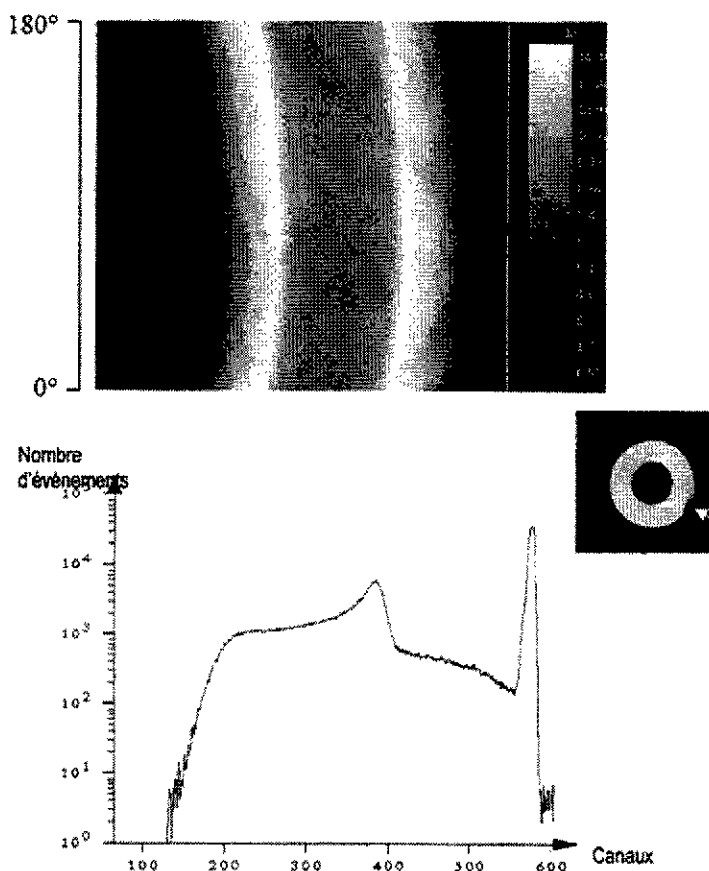


Fig. 14 : Représentation des données après analyse d'une coupe d'un micro-capillaire de verre. Sur le sinogramme (a), les projections ont été codées à l'aide d'une échelle de 26 nuances de gris, allant de 0 (noir) à 14,97 mg/cm² (blanc). Chacune des 100 lignes horizontales (une par projection angulaire) comporte 128 points (un par rayon de projection). Le mouvement d'un défaut de surface (b) de l'échantillon est clairement visible sur le sinogramme sous la forme d'une trajectoire sinusoïdale sombre. Le spectre en énergie des protons détectés au cours de l'analyse complète de ce plan est reporté en (c). Le canal 578 correspond à l'énergie incidente des protons, soit 2,8 MeV, alors que l'énergie résiduelle minimale enregistrée est de 442 keV (canal 130).

Seuls les points de l'axe de rotation se projettent toujours à la même position, définie par l'axe central des sinusoides. Le sinogramme présente donc à lui seul l'ensemble des données obtenues au cours de la procédure d'acquisition. L'exemple présenté ci-dessus correspond à l'analyse d'un plan d'un micro-capillaire de verre. Les épaisseurs ont été déduites des énergies résiduelles calculées en considérant une composition SiO_2 uniforme.

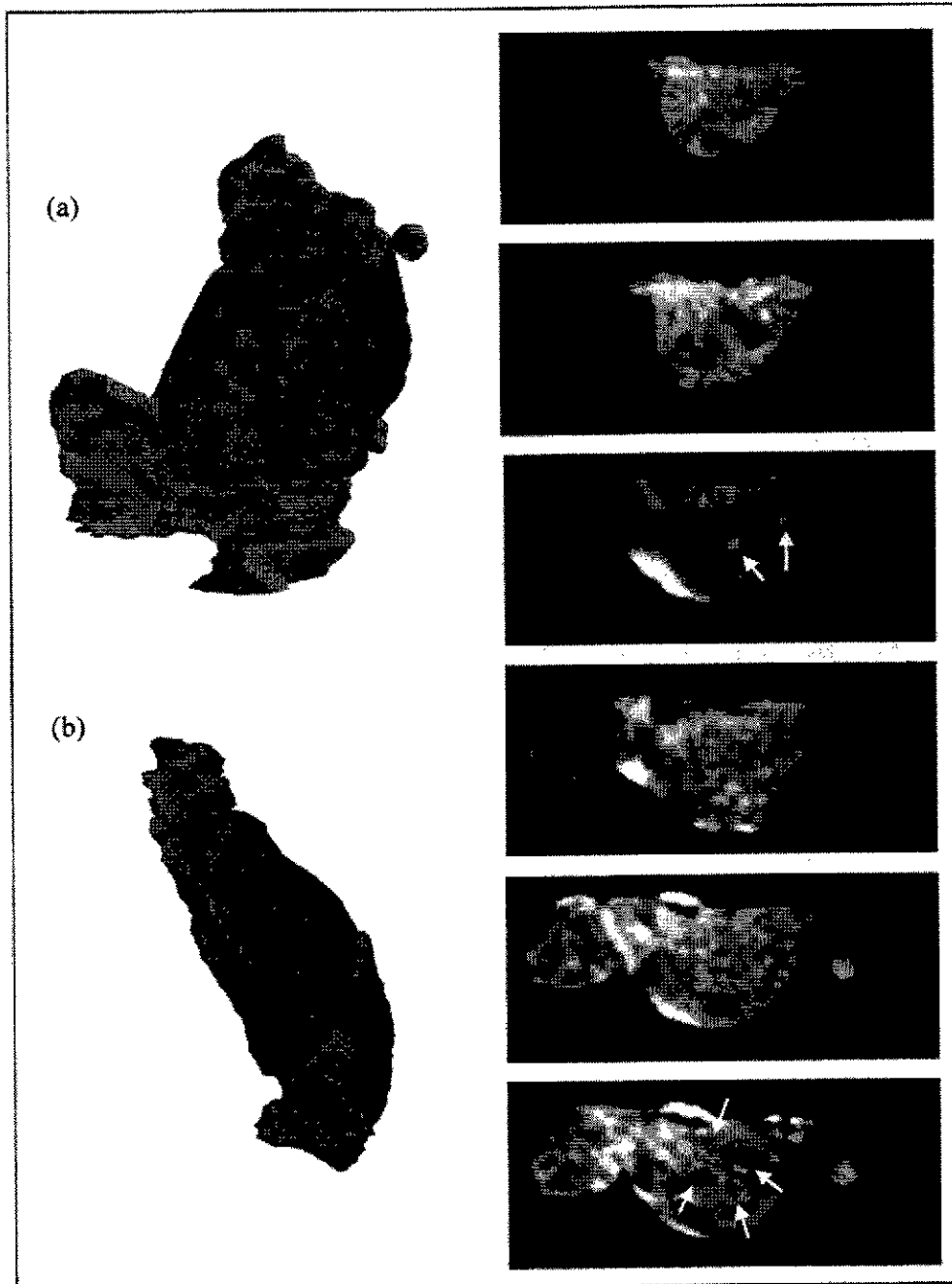


Fig. 15: Structure tridimensionnelle complète d'une cellule IGROV1-DDP : enveloppe externe du spécimen, vue de face (a) et de profil (b). La face basale, aplatie, apparaît sur la vue (b). 64 plans de coupe ont été reconstruits pour constituer l'image 3D. Ils sont numérotés de 1 à 64 en partant du haut de l'image. Les plans (c), (d), (e), (f), (g) et (h) correspondent respectivement aux plans de coupe numéro 24, 26, 33, 37, 42 et 44. L'échelle de niveaux de gris va de 0,054 à 0,154 g/cm³ pour tous les plans sauf pour (d), de 0,061 à 0,135 g/cm³, et pour (f), de 0,069 à 0,231 g/cm³. Conditions d'analyse : faisceau de protons de 2,8 MeV ; surface balayée : 166×166 μm². Les flèches indiquent des lobes nucléaires (h) et des nucléoles(e) (Michelet et Moretto, 1999).

V. APPLICATION A L'ETUDE DE MODELES PHYSIOLOGIQUES EXPERIMENTAUX

Dans le milieu vivant, les ions inorganiques (minéraux) sont très compartimentés, que ce soit à l'échelle des tissus ou à l'échelle cellulaire. La microanalyse par fluorescence X mise en œuvre à l'aide d'un microfaisceau permet, en cartographiant simplement ces minéraux (Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca...), de révéler l'ultrastructure tissulaire, parfois même de différencier des structures microscopiques uniquement par leur composition ionique (monocouches cellulaires endothéliales ou épithéliales par exemple). Cette capacité est exploitée depuis plusieurs années auprès de la microsonde du CENBG dans l'étude de modèles expérimentaux (Bara *et al.*, 1996). Les concentrations ioniques sont en général très stables dans le milieu vivant. Leur modification sous l'effet d'un stress physiologique ou d'une substance active peut alors être directement mise en évidence par microanalyse de la structure impliquée.

Milieu extracellulaire et distribution ionique dans les vaisseaux placentaires

Le vaisseau placentaire humain est un modèle expérimental développé initialement par les physiologistes pour étudier l'implication de divers cations, en particulier Mg^{2+} , dans les phénomènes contractiles des muscles lisses vasculaires. En raison de ses dimensions (diamètre d'environ 2 mm), l'artère placentaire humaine est particulièrement bien adaptée à la microanalyse par sonde nucléaire PIXE. La cartographie des minéraux dans les coupes transversales de la paroi artérielle permet de délimiter très précisément les différentes tuniques comme on peut le voir sur la figure suivante:

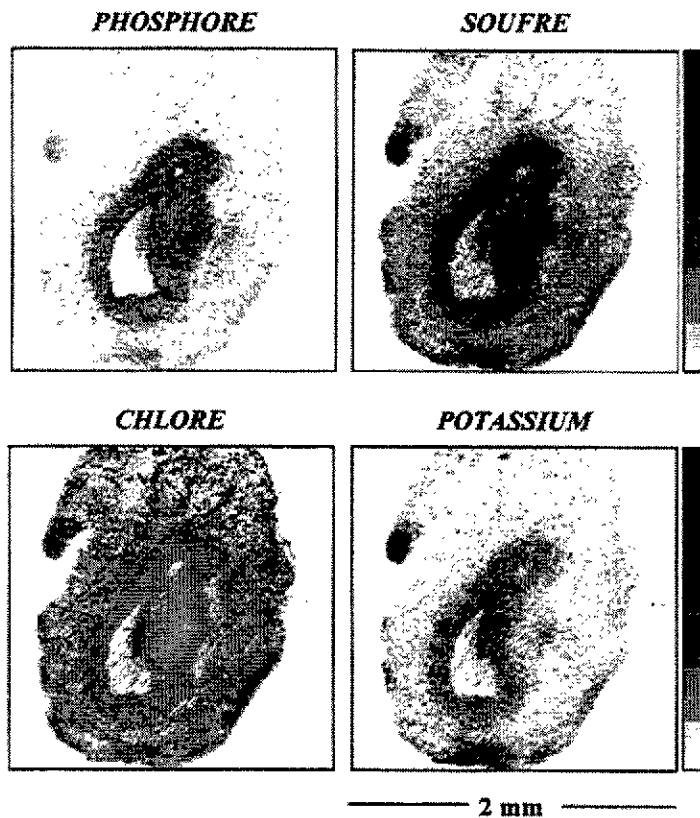


Fig. 16 : Microanalyse PIXE d'une section transversale d'artère placentaire: La structure riche en P, S et K (tunica media) se distingue clairement de la couche externe (tunica adventitia).

Les modifications des distributions et concentrations ioniques (Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) dans les différentes couches (media, adventice) peuvent être ainsi mesurées après incubation dans des milieux extracellulaires de composition diverses afin d'en évaluer les effets. Des mouvements ioniques ont même pu être mis en évidence au niveau des cellules endothéliales des

parois vasculaires.

Microanalyse d'épiderme humain

Etudier l'anatomie de la peau humaine, tissu d'épaisseur inférieure à quelques centaines de microns nécessite des techniques d'investigation à l'échelle microscopique. L'analyse par microsonde nucléaire est particulièrement bien adaptée puisque la cartographie chimique élémentaire par fluorescence X permet de différencier précisément les différentes strates constitutives de l'épiderme en fonction de leur composition en minéraux et de leur densité organique (Moretto *et al.*, 1999).

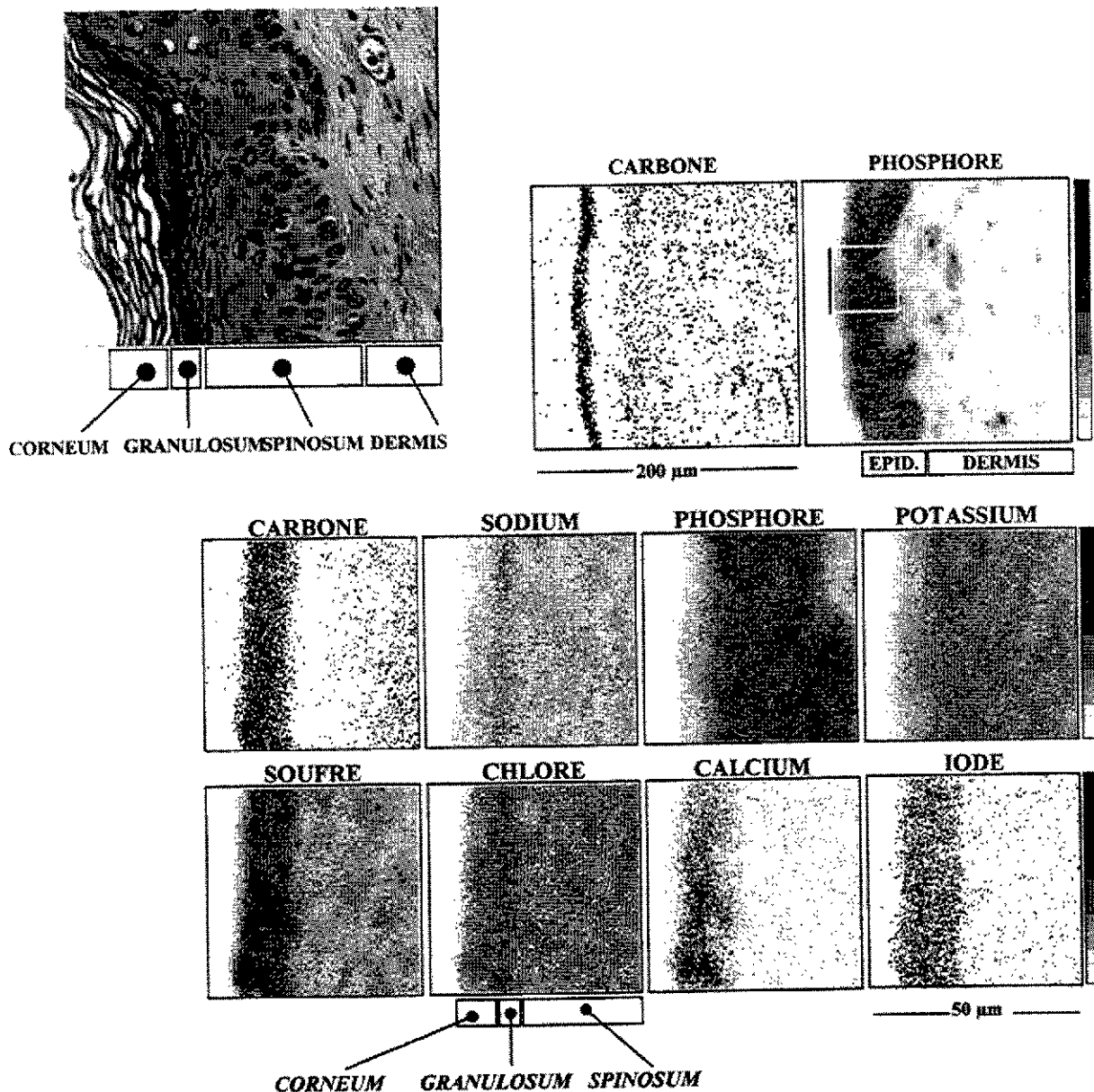


Fig. 17 : coupe histologique et analyse PIXE/RBS des minéraux dans les différentes couches de la peau humaine normale. A faible grossissement (cartographies du haut, balayage 200 µm) le derme se différencie de l'épiderme par une forte concentration en phosphore. A plus fort grossissement (les huit cartographies du bas, balayage 50 µm) l'analyse de l'épiderme seul permet de différencier les couches cornée (carbone élevé), granuleuse (sodium élevé) et épineuse (phosphore et potassium élevés). L'iode présent dans la couche cornée provient du traitement par la bétadine avant prélèvement.

Les applications de ce modèle vont de la dermocosmétologie pour l'étude de la diffusion de substances exogènes à travers la barrière cutanée, à l'aide au développement de tissus artificiels (feuillet de peau reconstituée) par caractérisation comparée avec la peau native, en passant par des études plus fondamentales de peaux pathologiques.

VI. OPTIMISATION DES METHODES LOCALES D'ADMINISTRATION DE SUBSTANCES ANTICANCEREUSES

La résistance des tumeurs solides à la chimiothérapie conventionnelle mène souvent à des échecs thérapeutiques. Elle peut s'expliquer par différents facteurs tels que l'architecture tumorale ou la faible vascularisation qui mènent à une pénétration insuffisante de la drogue dans les tissus. Dans la plupart de ces tumeurs, les vaisseaux se localisent en périphérie ce qui limite la vascularisation des structures internes. D'autre part, une pression interstitielle élevée due essentiellement à l'organisation histologique du tissu tumoral provoque un effet de barrière qui intervient notamment autour des vaisseaux et capillaires, empêchant ainsi les substances cytotoxiques d'atteindre leur cible. Afin d'augmenter les concentrations locales et diminuer la toxicité secondaire, différentes méthodes d'administration locales existent: chimiothérapie intratumorale, péritumorale ou encore intrapéritonéale pour des tumeurs localisées dans la cavité péritonéale. Cependant, ces méthodes ne sont encore que très peu ou pas employées en clinique à cause d'une mauvaise reproductibilité et d'une hétérogénéité dans la répartition tissulaire du composé antimitotique.

L'analyse PIXE par microsonde nucléaire est un outil très performant pour révéler la distribution spatiale de la substance thérapeutique dans le tissu tumoral, en particulier celle du cisplatine. De cette

manière on peut comparer l'efficacité des divers modes de traitement dans leur capacité à délivrer la drogue en concentration élevée et homogène au cœur du tissu tumoral. Nous avons ainsi étudié au cours des dernières années les effets de certaines molécules connues pour leur action délétère sur la structure histologique du tissu (EDTA, collagénase, hyaluronidase, pronase).

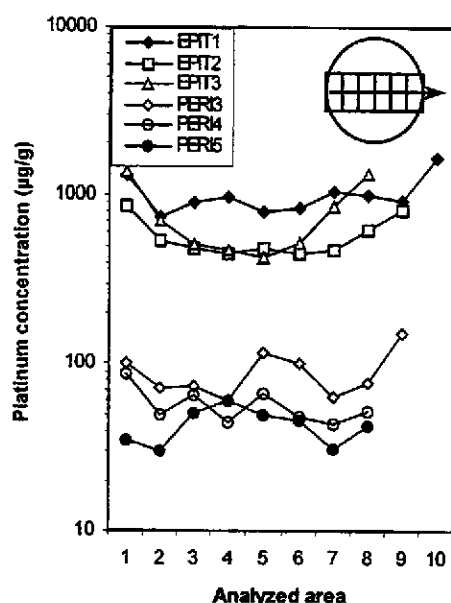


Fig. 18 : Mise en évidence de l'effet potentialisateur de l'épinéphrine sur la chimiothérapie péritumorale. Distribution en platine le long du diamètre de 6 nodules tumoraux (diamètre d'environ 4 mm) après traitement péritumoral par le cisplatine en présence (EPIT) et en l'absence (PERI) d'épinéphrine

Puis nous nous sommes penchés sur l'action potentialisatrice de l'épinéphrine, un vasoconstricteur qui, en diminuant le flux sanguin dans le tissu tumoral, peut retarder la résorption systémique de la drogue et augmenter ainsi la durée de l'exposition. Ces études ont été menées sur un modèle animal de tumeur colique greffée en sous-cutané et dans la cavité péritonéale chez le rat (Duvillard *et al.*, 1999).

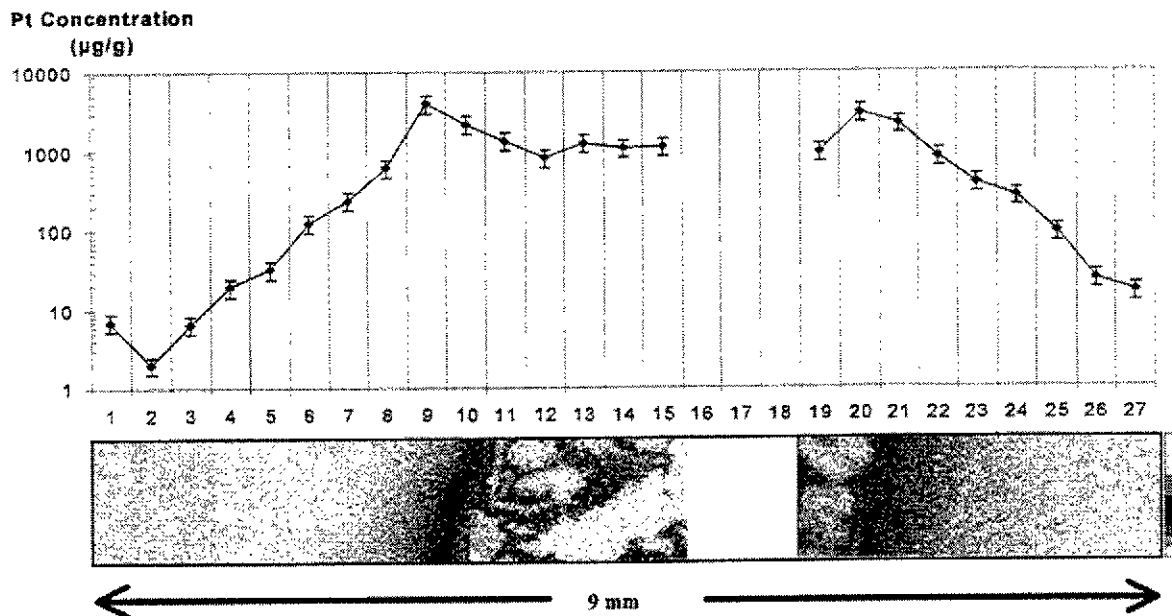


Fig 19 : Distribution transverse du platine dans une coupe de tumeur murine après implantation d'un gel de cisplatine (visible au centre sur la cartographie du bas). Un gradient décroissant de concentration est clairement visible du centre vers la périphérie du nodule tumoral.

VII. PATHOLOGIE : MICROANALYSE DE BIOPSIES MUSCULAIRES

Dans le domaine de l'anatomopathologie et de la clinique, l'analyse chimique de biopsies de tissus par microsonde nucléaire peut se révéler extrêmement utile, en particulier dans certaines pathologies résultant de désordres métaboliques, de surcharges métalliques ou d'accumulation en éléments exogènes, voire toxiques. La possibilité de cartographier et donc de repérer directement les structures histologiques impliquées est un atout important. Sur le plan méthodologique, le caractère multiélémentaire de cette technique ainsi qu'une résolution spatiale de l'ordre du micron, sont particulièrement bien adaptés à l'analyse de coupes de tissus.

La myofasciite à macrophages : une nouvelle pathologie musculaire

Une myopathie inflammatoire, jusqu'alors jamais décrite vient d'apparaître en France. Depuis 1993, date à laquelle le premier cas a été rapporté par le Dr Coquet à Bordeaux, seulement une trentaine de cas ont été répertoriés à ce jour dans 5 centres de myopathologie en France (Gherardi *et al.*, 1998). Cette maladie est caractérisée par une infiltration du fascia (tissu conjonctif sous cutané entourant le

muscle) et du muscle contigu, par des travées de larges macrophages contenant des inclusions granulaires intracytoplasmiques denses. Des études en microscopie électronique ont montré que ces inclusions se présentaient sous la forme de spicules dont la nature est jusqu'à présent restée indéterminée.

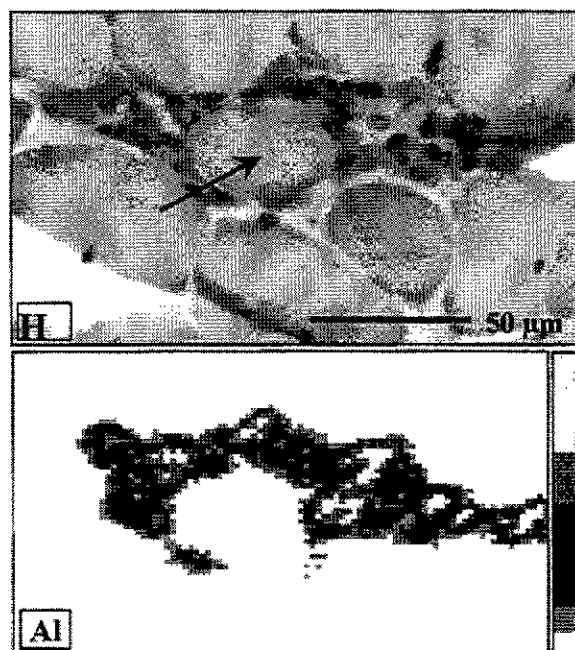


Fig. 20 : Microscopie optique (H) d'une coupe à congélation (coloration Hématoxyline-éosine) et distribution de l'aluminium (Al) après microanalyse d'une coupe adjacente par micro-PIXE. Une fibre musculaire (indiquée par la flèche est clairement entourée par une travée de macrophages très riches en aluminium.

Il y a quelques mois, l'étiologie de cette pathologie était encore inconnue. Deux hypothèses restaient à vérifier. L'une tendait à impliquer des agents infectieux pathogènes et l'autre un facteur toxique qui responsable d'une maladie de surcharge acquise par accumulation de substance exogène. Des analyses de biopsies musculaires ont été réalisées au CENBG afin d'essayer de déterminer la nature chimique des infiltrations mises en évidence. La microanalyse par sonde nucléaire a permis de montrer une accumulation localisée d'aluminium dans les zones lésées. Une étude clinique des cas enregistrés a ensuite permis de montrer que cette accumulation pouvait provenir de vaccinations récentes par voie intramusculaire à l'aide de vaccins contenant de l'aluminium¹. Les recherches se portent actuellement vers l'hypothèse selon laquelle certains sujets chez lesquels l'élimination de ce métal présent dans le muscle se fait difficilement (Gherardi et al., 2000).

Références bibliographiques

- Andersen H.H., Ziegler J.F. ; Stopping powers and ranges in all elements. *Pergamon Press, New York*, 1977, vol. 3 et 4.
- Bambynek W., Crasemann B., Fink W.R., Freund H.V., Mark H., Swift C.D., Price R.E., Rao P.V., X-ray fluorescence yields, Auger and Coster-Kronig transition probabilities. *Rev. Mod. Phys.* 1972, 44:716

¹ Weekly Epidemiological Record (World Health Organization), Vaccine safety, n° 41, 15 october 99, p338-340

M. Bara, Ph. Moretto, L. Razafindrabe, Y. Llabador, M. Simonoff, A. Guiet-Bara, Nuclear microanalysis of the effect of magnesium and taurine on the ionic distribution in the human amniotic membrane, *Cellular and Molecular Biology* 1996, Vol 42, n°1, 27-38

Brandt W., Lapicki G., Energy loss Effect in inner-shell Coulomb ionization by heavy charged particles. *Phys. Rev.* 1981, A23:173-175

Brooks R.A., Di Chiro G. ; Principles of Computer Assisted Tomography (CAT) in radiographic and radioisotopic imaging. *Phys. Med. Biol.* 1976, 21(5) 689-732.

Cohen D.D., Harrigan M., Atomic Data and Nuclear Data Tables 1985, 33:255

Cohen D.D., Clayton E., Ion induced X-ray Emission in ion beams for Materials analysis, Bird J.R. & Williams J.S. Edts, *Academic Press* 1989, pp209-260

Ch. Du villard, L. Benoit, Ph. Moretto, J.L. Beltramo, P. Brunet-Lecomte, E. Solary, B. Chauffert, Epinephrine enhances penetration and anti-cancer activity of local cisplatin on rat sub-cutaneous and peritoneal tumors. *Int. J. Cancer* 1999, 81:779-784

Garcia J.D. Inner-shell Ionisations by proton impact. *Phys. Rev.* 1970, A1:280

R.K. Gherardi, M. Coquet, P. Chérin, F.J. Authier, P. Laforêt, L. Bélec, D. Figarella-Branger, J.M. Mussini, J.F. Pellissier, M. Fardeau for the GERMMAD, Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *The Lancet* 1998, 352, August 1, 347-352

R.K. Gherardi, M. Coquet, P. Chérin, L. Belec, Ph. Moretto, D. Figarella-Branger, P. Chariot, F.J. Authier. Macrophagic myofasciitis : a reaction to intramuscular injection of aluminium-containing vaccines, A paraître dans *New Engl. J. Medicine* en 2000.

Grime J.W. and Watt F., Beam optics of quadrupole probe-forming systems. Adam Hilger Ltd, Bristol, 1984

Hansteen J.M., Mosebeke O.R., Atomic Coulomb excitation by heavy charged particles. *Nucl. Phys.* 1973, A201:541-560

Janni J.F. ; Proton range-energy tables, 1keV-10 GeV. *Atom. Data and Nucl. Data Tables* 1982, 27: 2/3 et 4/5

Johansson T.B., Akselson R., Johansson S.A.E., X-ray analysis: elemental trace analysis at the 10^{-12} level. *Nucl. Instr. and Meth.* 1970, B84:141-143

Johansson S.A.E., Johansson T.B., Analytical applications of Particle Induced X-ray Emission. *Nucl. Instr. and Meth.* 1976, B137: 473-516.

Johansson S.A.E., Campbell J.L. PIXE: A novel Technique for elemental Analysis, Wiley, Hichester, UK, 1988

Maxwell J.A., Campbell J.L., Teesdale W.J., The Guelph PIXE software Package. *Nucl. Instr. and Meth.* 1989, B43:218-230

Merzbacher E., Lewis H.W. in *Hnadbuch der Physik* 34, S. Flugge editor, Springer Verlag, Berlin, 1958, p 166

Michelet Claire, Moretto Ph. 3D mapping of individual cells using a proton microbeam. *Nucl. Instr. and Meth.* 1999, B150: 173-178

Michelet Claire, Moretto Ph., STIM tomography at the cell level. *Nucl. Instr. and Meth.* 1999, B158: 361-367

Mitchell I.V., Barfoot K.M., Particle Induced X-ray Emission Analysis, applications to analytical problems. *Nuclear Science Applications*, sec 6, 1981, 11(2):101-162

Moretto Ph., Llabador Y. , The Nuclear Microprobe: an insight of applications in cell biology. *Nucl. Instr. and Meth.* 1997, B130: 324-344

Ph. Moretto, J.E. Surlève-Bazeille, D. Licu, C. Michelet, Micronalysis of the human skin structure: preliminary results. *Nucl. Instr. and Meth.* 1999, B158 : 386-392.

Peyrin F., Garnero L., Magnin I. ; Introduction à l'imagerie tomographique 2D et 3D reposant sur une propagation en ligne droite. Cas de la tomographie par rayons X, par émission et par ultrasons. *Traitement du Signal*, 1996, vol 13 n°4.

Salem S.I., Panossian S.L., Krause R.A., Experimental K and L relative X-ray emission rates. *Atomic Data and Nuclear Data Tables* 1974, 14(2):91-109